

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Identificación de los microorganismos fermentadores de diferentes Chichas de jora (Cerveza Andina) provenientes de la región Norte del Ecuador

Proyecto de Investigación

Joselyn Paola Rivera Torres
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 21 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Identificación de los microorganismos fermentadores de diferentes Chichas de Jora (Cerveza Andina) provenientes de la región Norte del Ecuador

Joselyn Paola Rivera Torres

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, Ph. D.

Firma del profesor

Quito, 21 de mayo de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Joselyn Paola Rivera Torres

Código:

00118126

Cédula de Identidad:

1722313333

Lugar y fecha:

Quito, mayo de 2019

DEDICATORIA

A mi hija, mis padres, mi hermano y mi novio que han estado en todo momento junto a mí, por ser las personas más importantes de mi vida, por brindarme todo el apoyo a lo largo de la carrera, y motivarme a seguir adelante en mis sueños y metas. Sin ellos no hubiera sido posible formarme como profesional y persona.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a toda mi familia y amigos cercanos que han estado en este proceso.

A mis padres, Fabián y Sandra por brindarme educación de calidad, por apoyarme en los momentos difíciles, darme amor y por no dejar decaiga en el camino.

A mi hija Valeria por ser mi motor, mi fuerza y mi todo.

A mi hermano, Andrés por siempre estar pendiente y apoyarme.

A mi novio, Ricardo por brindarme su apoyo, cariño y paciencia a lo largo de la carrera.

A Juan Mosquera, por haberme ayudado en cada paso del trabajo de titulación, por brindarme soluciones oportunas, por tenerme paciencia, por cada enseñanza, por cada retroalimentación como profesional y por ayudarme a lograr esta meta.

A mi directora de tesis, Sonia Zapata por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Instituto de Microbiología en este interesante proyecto, por sus retroalimentaciones y sobre todo su paciencia.

A Mike Koziol y el Colegio de Hospitalidad Arte Culinario y Turismo (CHAT) por el apoyo financiero en todo el proyecto de investigación.

RESUMEN

La chicha es una bebida alcohólica artesanal producida y consumida en países de Sudamérica como Ecuador. En Ecuador, se produce en provincias como Chimborazo, Imbabura, Azuay, Pichincha y Bolívar. Desde la época prehispánica la chicha de jora (maíz germinado) se ha considerado una fuente de nutrición y un producto clave en intercambios sociales, políticos y culturales. Esta bebida ha pasado por un proceso de fermentación gracias a la acción de varios microorganismos. Las características organolépticas obtenidas como un olor, sabor y textura deseables han motivado al ser humano a replicar el proceso de fermentación y; por ende, comprender todo lo que esto implica, es decir conocer acerca de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos como los microorganismos involucrados en la fermentación e inocuidad de la chicha con el fin de obtener un producto que cumpla con estándares de calidad en la industria. Es por ello, que en este estudio se identificó los microorganismos responsables de la fermentación de diferentes chichas de jora de la región Norte del Ecuador, se determinaron los parámetros fisicoquímicos y se realizó un análisis de calidad microbiológica con el fin de obtener en un futuro un proceso de fermentación uniforme y predecible. Se recolectaron 24 muestras procedentes de la provincia de Pichincha, Imbabura y Chimborazo entre marzo y mayo 2018. Se identificó un total de 7 especies de levaduras: *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica* y *Candida krusei*. A través de la amplificación y secuenciamiento de la región V4 del gen 16S ADNr se identificó a *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*. En cuanto a los parámetros físico – químicos el pH de las chichas estuvo en un rango de 3,1 a 4,3; un rango de etanol de 0,1- 5,6% y un rango de acidez de 0,2 - 5,1%. Tanto las BAL como las levaduras son responsables del aroma, sabor, textura y concentración de alcohol de la chicha. La mayoría de las chichas no mostraron variación en cuanto a la microbiota presente, lo que sugiere un proceso uniforme de elaboración de la chicha.

Palabras clave: chicha de jora, fermentación, calidad microbiológica, bacterias ácido lácticas, levaduras, pH, etanol, acidez

ABSTRACT

Chicha is an artisanal alcoholic beverage produced and consumed in South American countries such as Ecuador. In Ecuador, it is produced in provinces such as Chimborazo, Imbabura, Azuay, Pichincha and Bolívar. Since pre-Hispanic times, chicha de jora (germinated corn) has been considered a source of nutrition and a key product in social, political and cultural exchanges. This drink has gone through a fermentation process thanks to the action of several microorganisms. The organoleptic characteristics obtained as a desirable smell, taste and texture have motivated the human being to replicate the fermentation process and; therefore, to understand all that this implies, is to know about the physicochemical and microbiological parameters such as the microorganisms involved in the fermentation and harmless nature of the chicha in order to obtain a product that meets quality standards in the industry. That is why, in this study, the microorganisms responsible for the fermentation of different chichas de jora from the North of Ecuador were identified, the physicochemical parameters were determined and a microbiological quality analysis was carried out in order to obtain a future uniform and predictable fermentation process. 24 samples were collected from the province of Pichincha, Imbabura and Chimborazo between March and May 2018. Through identification with the API 20Aux kit a total of 7 yeast species were identified: *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica* and *Candida krusei*. Amplification and sequencing of the 16S rDNA gene region identified *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei*. As for the physical - chemical parameters, the pH of the chichas was in a range of 3.1 to 4.3, an ethanol range of 0.1 - 5.6% and an acidity range of 0.2 - 5 %. Both the BAL and the yeasts are responsible for the aroma, flavor, texture and alcohol concentration of the chicha. The majority of the chichas did not show variation in the microbiota present, which suggests a uniform process of chicha elaboration.

Key words: chicha de jora, fermentation, microbiological quality, lactic acid bacteria, yeasts, pH, ethanol, acidity

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	12
1.1 Chicha (bebida fermentada artesanal).....	12
1.2 Elaboración de la chicha de jora.	13
1.3 Microorganismos fermentadores.....	14
1.3.1 Bacterias ácido lácticas.	16
1.3.2 Levaduras.	17
1.4 Indicadores microbiológicos de calidad e inocuidad.	18
1.4.1 <i>Escherichia coli</i>	19
1.4.2 Coliformes totales.	19
1.5 Parámetros fisicoquímicos.	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo General.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	24
5.1 Recolección de muestras.....	24
5.2 Procesamiento de muestras.....	24
5.3 Recuento <i>Escherichia coli</i> y Coliformes.....	24
5.4 Aislamiento e Identificación de levaduras	24
5.5 Aislamiento e Identificación de bacterias ácido lácticas	25
5.6 Criopreservación de bacterias ácido lácticas identificadas.....	25
5.7 Reactivación bacterias criopreservadas.....	25
5.8 Extracción ADN por ebullición.....	26
5.9 PCR para gen 16S ARNr.....	26
5.10 Secuenciamiento del producto de PCR de la región del gen 16S ARNr	27
5.11 Identificación de bacterias ácido lácticas a partir de secuenciamiento de ADN..	27
6. MÉTODOS	28
6.1 Obtención de las muestras.....	28
6.2 Preparación de diluciones a partir de muestras (chichas de jora)	28
6.3 Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes	29
6.4 Aislamiento e identificación de levaduras.....	29
6.5 Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas	30
6.6 Identificación molecular	31
6.6.1 Extracción de ADN.....	31
6.6.2 PCR para gen 16s rARN	31
6.7 Análisis de secuencias de ADN e identificación de especies de bacterias ácido lácticas.....	32
6.8 Análisis fisicoquímicos.....	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Recuento de <i>E. coli</i> y Coliformes	33
7.2 Aislamiento e identificación de levaduras.....	34
7.3 Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas	35
7.4 Identificación molecular	35

7.4.1	Amplificación de la región del gen 16S ARNr mediante PCR.....	35
7.4.2	Análisis de secuencias de ADN e identificación molecular de bacterias ácido lácticas	36
7.5	Determinación de parámetros fisicoquímicos	37
8.	DISCUSIÓN	39
8.1	Recuento de <i>E. coli</i> y Coliformes	39
8.2	Aislamiento e identificación de levaduras.....	41
8.3	Identificación molecular de bacterias ácido lácticas.....	45
8.4	Parámetros fisicoquímicos	46
9.	CONCLUSIONES.....	48
10.	RECOMENDACIONES	49
11.	Referencias bibliográficas	50
12.	anexos	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Origen de las 8 chichas recibidas provenientes de la región Norte del Ecuador.....	28
Tabla N° 2	Recuento de <i>E. coli</i> y Coliformes en las 24 chichas de diferentes tiempos ..	33
Tabla N° 3	Especies de levaduras identificadas en las 24 chichas de diferentes tiempos	34
Tabla N° 4	Especies de BAL identificadas mediante secuenciación de ADN	37
Tabla N° 5	Parámetros fisicoquímicos de las 24 chichas en diferentes tiempos.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Cultivo puro de levaduras aisladas por técnica de estriado de la dilución 10^0 en medio de cultivo Sabouraud.....	34
Figura N° 2 Identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas	35
Figura N° 3 Amplificación de la región del gen 16S ARNr	36
Figura N° 4 Amplificación de la región del gen 16S ARNr	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Chicha (bebida fermentada artesanal)

La chicha es una bebida alcohólica artesanal producida y consumida en países de Sudamérica como Ecuador, Colombia, Perú, Chile y Bolivia (Asanza, 2018). En Ecuador, en la Sierra se produce en provincias como Chimborazo, Imbabura, Azuay, Pichincha y Bolívar y en la Amazonía, en Morona, Pastaza y Sucumbíos (Asanza, 2018). Existen varios tipos de chichas de acuerdo al sustrato utilizado, esta puede elaborarse a partir de maíz, piña, trigo, yuca, maní y arroz (Freire, 2015). Desde la época prehispánica la chicha de jora (maíz germinado) se ha considerado una fuente de nutrición y un producto clave en intercambios sociales, políticos y culturales. Se considera como un componente principal y significativo de la dieta de numerosos países alrededor del mundo, así como de países en desarrollo, debido a la calidad que mantienen en condiciones adversas como un indebido almacenamiento, escasos métodos de conservas y refrigeración, contribuyendo a la seguridad alimentaria (FAO, 2018). Es una bebida con una buena calidad nutricional ya que es rica en proteínas, calcio, fósforo, tiamina, riboflavina y niacina, son tradicionalmente aceptables y sobre todo accesibles (Marshall & Mejía, 2012). Algunas comunidades indígenas ecuatorianas consumen chicha como una bebida ceremonial, en funerales y mingas (López, et al, 2014). Comunidades como Coltas, y Pulacates ubicadas en la provincia de Chimborazo consumen chicha cotidianamente y en fiestas populares como carnaval, los Santos Reyes y Semana Santa (Rosas, 2012). Mientras que las comunidades Guarandas, Vinchoas y Facundos mantienen a la chicha en su condición ceremonial durante representaciones alegóricas a las fiestas incaicas y; además, la usan durante pagos a la Tierra y en actividades como fiestas patronales, matrimonios e incluso velorios (Rosas, 2012). Por otra parte, en comunidades indígenas de la Amazonía

como los Shiwiar y los Achuar consumen la chicha como sustento único en largas jordanas de casería, en mingas, en fiestas religiosas, y en uso cotidiano (Rosas, 2012).

La chicha es un producto que ha pasado por un proceso de fermentación gracias a la acción de varios microorganismos entre ellos microorganismos ambientales, incluyendo microorganismos de los utensilios utilizados (Martini, 1993). Las características organolépticas obtenidas en este producto fermentado como un olor, sabor y textura deseables han motivado al ser humano a replicar el proceso de fermentación y; por ende, comprender todo lo que esto implica, es decir conocer acerca de los parámetros microbiológicos como los microorganismos involucrados en la fermentación e inocuidad de la chicha con el fin de obtener un producto que cumpla con estándares de calidad en la industria (ACG, 2005). Actualmente, existen pocos estudios acerca de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las chichas, en esta investigación varios chefs de la Universidad San Francisco de Quito cataron varias chichas elaboradas en restaurantes y un mercado de la región norte del Ecuador y eligieron chichas elaboradas en 8 lugares diferentes con las mejores características organolépticas para el estudio. Es de suma importancia realizar estos análisis con el fin de determinar la relación de estos parámetros con las características organolépticas a través del tiempo y en un futuro tener un proceso de fermentación uniforme y predecible. Además, al ser una bebida artesanal y consumida por público en general, es esencial el análisis de calidad microbiológica.

1.2 Elaboración de la chicha de jora

El modo de preparación de la chicha de jora varía de acuerdo al país y lugar; en Ecuador, se comienza con el grano germinado en donde el maíz tiene que permanecer en remojo durante 3 días a una temperatura de 20° C (Vallejo, et al., 2013); después, se agrega una cantidad

adecuada de agua y la mezcla se somete a cocción durante 30 minutos. La última etapa es de pre-fermentación en donde se remueve los residuos del grano y una proporción de chicha antigua que tendrá los microorganismos que van a realizar la fermentación de los azúcares del maíz, también se pueden agregar distintos ingredientes como azúcar y canela, para posteriormente dejarlo reposar en un recipiente sellado y la fermentación ocurra en 15 a 20 días (Freire, 2015). La microbiota fermentadora implicada en la chicha varía dependiendo de las condiciones ambientales, los recipientes de fermentación y los tipos de pre fermentación. En un estudio realizado por Chang, et al, (2012) se encontraron 8 especies de levaduras de recipientes antiguos en Quito utilizados para fermentar, lo que demuestra que la naturaleza del recipiente permite que el microorganismo fermentador se adhiera a las paredes contribuyendo al proceso de fermentación. Los recipientes utilizados para la producción varían en ciertos detalles de acuerdo a la comunidad productora (Hayashida, 2018). Por otra parte, esta bebida posee un contenido de alcohol del 2 al 12%, este porcentaje puede incrementar dejando reposar la chicha durante algunos meses o añadiendo más fuentes de azúcar como las frutas (Liguori, et al, 2015).

1.3 Microorganismos fermentadores

La fermentación se considera un proceso catabólico que se da en condiciones de anaerobiosis en donde un compuesto orgánico es el aceptor final de electrones (Sanlier, et al., 2017). La fermentación anaeróbica puede ser alcohólica o ácido láctica (Sanlier., et al., 2017). Es un proceso en donde distintos microorganismos como bacterias ácido lácticas, enterobacterias, mohos y levaduras descomponen los carbohidratos fermentables en moléculas orgánicas como el alcohol y ácido láctico y en moléculas inorgánicas como el dióxido de carbono, es importante mencionar que en la fermentación ocurre una oxidación incompleta (López, 2015). Además, se producen varios metabolitos antibacterianos como las bacteriocinas

(López, 2015). La fermentación incrementa la vida útil del alimento o bebida, especialmente en alimentos perecederos y mejora las propiedades organolépticas del mismo, los ácidos orgánicos, el etanol y el dióxido de carbono producidos van a controlar el crecimiento de microorganismos que deterioran los alimentos y debido a que la oxidación solamente es parcial, el alimento retiene suficiente potencial energético para ser beneficiosos para el consumo (Caplice y Fitzgerald, 1999).

También, se mejora la digestibilidad de las proteínas y carbohidratos, así como la biodisponibilidad de vitaminas y minerales (Sanlier, et al., 2017). Es importante mencionar que estos beneficios se encuentran asociados a los péptidos bioactivos que son sintetizados en la degradación de proteínas por acción de bacterias ácido lácticas implicadas en la fermentación (Olivares, et al., 2011).

Los microorganismos fermentadores asociados a la chicha de jora son bacterias ácido lácticas, levaduras e incluso ciertas Enterobacterias como *Escherichia coli* (Pazmiño, 2013). Estos, van a determinar las características de la chicha, es decir, su acidez, sabor, textura, así como también la composición nutricional (Prakash, et al., 2015). Estos microorganismos se encuentran como la microbiota nativa en el alimento o pueden ser añadidos como un cultivo starter (Pazmiño, 2013). En la mayoría de fermentaciones espontáneas, se produce una sucesión microbiana, bacterias ácido lácticas generalmente dominan inicialmente el proceso, seguido por distintas especies de levaduras. Las bacterias ácido lácticas van a producir ácido láctico y otros compuestos que van a inhibir el crecimiento de otros microorganismos patógenos reduciendo también el azúcar disponible en el medio prolongando la vida útil del alimento o bebida, mientras que las levaduras principalmente producirán compuestos de sabor, aroma y alcohol (Inungaray, 2013). Las levaduras juegan un rol esencial en los todos los productos fermentados, se utilizan a nivel industrial en la producción de bebidas alcohólicas, a partir de estas se pueden obtener enzimas y saborizantes, se usan para fortificar

alimentos, forman parte de comunidades microbianas complejas y en algunos casos se consumen directamente (Pazmiño, 2013).

1.3.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias Gram positivas, catalasa negativa, oxidasa negativa (Ramírez, et al., 2011). Las BAL comparten diversas características morfológicas, fisiológicas y metabólicas (Freire, 2015). Pueden ser bacilos y cocos no esporulados, pueden ser anaerobios o aerotolerantes, crecen en un rango de pH de 3,2 a 9,6, pero en su mayoría crecen en pH de 4 a 4,5. Producen una gran cantidad de ácido láctico como resultado de la fermentación de carbohidratos (Freire, 2015). Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, han sido aisladas del tracto digestivo de mamíferos, de plantas, de alimentos y entre otros. Conforman un grande grupo bacteriano que se compone de aproximadamente 380 especies, 40 géneros y 6 familias (Prakash, et al, 2015), sin embargo, los géneros más representativos son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Salminen y Wright, 1993). Además, las LAB se dividen en dos grupos de acuerdo a la fermentación de azúcares que realizan. La primera es la fermentación homofermentativa que la realizan bacterias del género *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y algunos *Lactobacillus*, en donde el producto predominante del proceso es el ácido láctico. La segunda es la fermentación heterofermentativa llevada a cabo por bacterias del género *Weisella*, *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus*. Pueden ser heterofermentadores facultativos, quienes fermentan las hexosas produciendo pocas cantidades de ácido láctico, grandes cantidades de etanol y CO₂, y pueden ser heterofermentadores obligados quienes fermentan las hexosas produciendo ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂ (Prakash, et al., 2015). Las BAL en las chichas de jora, fermentan los carbohidratos disponibles produciendo

ácidos orgánicos como el ácido láctico y otros metabolitos que van a contribuir en la biopreservación, en las características organolépticas y la calidad nutritiva de la chicha.

1.3.2 Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares, agrupados en 350 especies clasificadas en 39 géneros, estos microorganismos se reproducen principalmente por gemación y en ocasiones por fisión (Pazmiño, 2013). Pueden crecer en un rango de pH de 4,5 -8 y en un rango de temperatura de 22-30° C (Mossel & Struijk, 2003). Especies de levaduras pueden ser identificadas y caracterizadas de acuerdo a su morfología, fisiología (pruebas de fermentación de azúcares), inmunología y pruebas moleculares (Pazmiño, 2013). En cuanto a su distribución, éstas pueden ser aisladas de distintos hábitats como el suelo, el agua, las plantas y animales (Monroy, et al, 2016). Las levaduras juegan un rol esencial en la fermentación para producir quesos, pan y diversas bebidas alcohólicas.

En el proceso de fermentación de la chicha de jora, las levaduras utilizan carbohidratos como fuente de energía, dando como resultado varios metabolitos, así como considerables cantidades de etanol, esteroides, fenoles y ácidos orgánicos que proporcionan las características organolépticas deseadas (Gibbons & Rinker, 2015). Los géneros de levaduras principalmente asociadas con el proceso de fermentación para la producción de bebidas alcohólicas como la chicha son *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulaspota*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* y *Rhodotorula* (Varela & Borneman, 2017). Es importante mencionar que al principio del proceso de fermentación de un producto fermentado es posible detectar una mayor diversidad de levaduras, y conforme el proceso sigue avanzando se presentan levaduras que poseen un alto poder fermentativo y además son caracterizadas por su resistencia al alcohol (López, et al, 2010).

1.4 Indicadores microbiológicos de calidad e inocuidad

La contaminación de los alimentos es una consecuencia directa de las deficiencias sanitarias durante el proceso de elaboración, manipulación, almacenamiento y las condiciones en que son provistas al consumidor (Blanco, et al., 2011). Según la OMS (2015), existen 250 tipos de enfermedades transmitidas por alimentos que se convierten en un problema de salud pública. Los microorganismos indicadores se emplean para reflejar la calidad microbiológica de la chicha de jora en relación a su vida útil y su inocuidad debido a la posible presencia de microorganismos patógenos en la bebida que resulta en un riesgo para la salud del consumidor. Los microorganismos indicadores deben cumplir con ciertos criterios para ser considerados un buen indicador. Deben encontrarse presentes y ser detectables en todos los alimentos que se desean analizar, deben ser detectados y distinguibles claramente de otros microorganismos y su crecimiento no debe verse afectado por otros componentes de la microbiota del alimento (Jay, et al., 2005). Además, los indicadores de calidad microbiana son considerados organismos de deterioro cuyo contaje elevado da como resultado una pérdida de calidad del producto (Jay, et al., 2005). En bebidas artesanales como la chicha, el análisis de calidad microbiológica es esencial debido a la deficiencia de higiene presente en su elaboración, los indicadores frecuentemente usados en análisis en chichas, son bacterias del grupo de Coliformes, que se representan por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Son un grupo de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativas, no forman esporas, son capaces de fermentar la lactosa a 37° C y son oxidasa negativos (Guínea, et al., 1979). Se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, en hábitats como el suelo, agua, plantas y en la microbiota intestinal de los seres humanos y animales, con excepción de *E. coli* que es de origen fecal. En la presente investigación, se analizó la presencia de *E. coli* y Coliformes totales.

1.4.1 *Escherichia coli*.

E. coli es una bacteria indicadora de contaminación fecal, asociada a la presencia de otros patógenos intestinales en el alimento, provocando que el consumidor ponga en riesgo su salud. Esta bacteria se considera un buen indicador de contaminación fecal debido a que exclusivamente se encuentra en heces y aguas residuales, se encuentran en el tracto intestinal del humano y de animales homeotermos, posee una escasa supervivencia en cuerpos de agua y fuentes no fecales y su detección es rápida (Larrea, et al., 2013). Además, se considera termotolerante ya que puede proliferar y fermentar lactosa a 44° C, tolera bajos pH (3,4-10) y porcentajes de etanol en un rango de 1- 4% (Haller, et al., 2009).

1.4.2 Coliformes totales

Coliformes son un grupo de bacterias fermentadoras capaces de producir gas, se multiplican en agua, suelo, alimentos y agua (Doyle, 2007). La presencia de Coliformes totales indica una contaminación ambiental en el alimento atribuida a distintos factores como la materia prima, los utensilios, los recipientes, el operario y entre otros (Ramos, et al., 2008). Además, bacterias de este grupo tienen la capacidad de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas provocando cambios en las características organolépticas del alimento (Campuzano, et al., 2015).

1.5 Parámetros fisicoquímicos.

El análisis fisicoquímico de los alimentos es de gran utilidad en procesos de control de calidad con el fin de asegurar que sean aptos para el consumo y que presenten las características químicas y de composición deseadas (Baroni, et al., 2017). Además, estos parámetros se encuentran estrechamente ligados con los microorganismos fermentadores y las características organolépticas del producto. Los parámetros fisicoquímicos que se realizan

comúnmente en la chicha son la medición del pH, los grados Brix, la acidez titulable y graduación alcohólica (Suárez, 2017). En cuanto a la medición de pH, de acuerdo a varios estudios se esperan valores bajos de pH en la chicha en un rango de 3- 5.5, los grados Brix en un rango de 4-12, el porcentaje de alcohol entre 4-7% y el porcentaje de acidez de 0,02- 2% (Escudero, 2014).

El objetivo de este estudio fue la identificación de los microorganismos fermentadores de la chicha de jora y correlacionar su presencia con pH, acidez y concentración de alcohol.

2. JUSTIFICACIÓN

Las chichas de jora, al ser una bebida tradicional del Ecuador, juegan un papel importante en diferentes eventos culturales del país. A menudo la producción de estas bebidas es artesanal, por tal motivo no requiere la adición de fermentos comerciales liofilizados. El proceso de fermentación se da de manera espontánea gracias a una diversidad de microorganismos que pertenecen al ambiente, a los utensilios o recipientes utilizados. Los usos de estas bebidas han jugado un rol esencial en la evolución de la sociedad humana, a pesar de esto, poco es conocido acerca de la diversidad de microorganismos presentes en las chichas de jora. En esta bebida tradicional, las bases fisicoquímicas, biológicas y microbiológicas del proceso de fermentación son poco conocidas, por lo cual es necesario conocer los microorganismos involucrados, con el fin de seleccionar las levaduras y bacterias ácido lácticas requeridas para que el proceso de elaboración a nivel industrial pueda ser estandarizado, sea más confiable en términos de calidad y más predecible. Además, la comprensión profunda de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos implicados en la chicha es necesario para obtener el resultado que se requiere en un principio, es decir con el sabor, aroma, contenido nutricional y textura deseado, así como porcentajes de etanol, acidez y pH deseados que se relacionan directamente con una larga vida útil. Así mismo, es importante determinar la microbiota presente en la chicha para determinar los tipos de beneficios que esta tiene para el ser humano y la posible actividad probiótica que los microorganismos presentes confieren a la bebida.

3. ÁREA DE ESTUDIO

Para el presente trabajo se recolectaron 24 chichas de jora provenientes de 8 diferentes lugares de la región Norte del Ecuador entre los meses marzo-mayo del 2018. Todas las muestras fueron chichas hechas a partir de maíz germinado (jora). Ninguna de estas bebidas fermentadas fue sometida a ningún tratamiento térmico, ni poseían aditivos ni preservantes comerciales. Todas las muestras fueron transportadas y conservadas a temperatura de 2 a 8° C. Se recolectaron 8 chichas provenientes de los 8 lugares diferentes en 3 tiempos distintos, es decir se recolectaron un total de 3 chichas por cada lugar obteniéndose 24 chichas en total. Se obtuvieron de la provincia de Imbabura (0°21'00"N 78°08'00"O), de la provincia de Pichincha (0°15'00"S 78°35'00"O) y de la provincia de Chimborazo (1°28'09"S 78°49'03"O). Todos los análisis fueron realizados en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito; desde marzo 2018 a marzo 2019.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar los microorganismos fermentadores de 24 chichas provenientes de diferentes lugares de la región Norte del Ecuador.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la calidad microbiológica de las chichas mediante un recuento de *E. coli* y Coliformes.
- Identificar las levaduras presentes por reacciones bioquímicas
- Identificar bacterias ácido-lácticas mediante la amplificación y secuenciamiento de la región V4 del gen 16S ARNr
- Determinar parámetros fisicoquímicos a través de la medición de pH, etanol y acidez.

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

5.1 Recolección de muestras

- Frascos de vidrio estériles
- Cooler
- Gel refrigerante

5.2 Procesamiento de muestras

- Agua peptonada 0,1 % (Difco)
- Puntas estériles (100-1000 µl)
- Micropipeta (100-1000 µl)
- Fundas estériles

5.3 Recuento *Escherichia coli* y Coliformes

- Medio Petrifilm para *E. coli* y coliformes (3M)
- Agua peptonada 0,1% (Difco)
- Micropipeta 100-1000 µl
- Puntas 100-1000 µl
- Incubadora (SANYO)

5.4 Aislamiento e Identificación de levaduras

- Agar Sabouraud (Difco)
- Antibiótico gentamicina (MK)
- Asa de estriación
- Hisopos
- Incubadora (SANYO)
- Kit API 20 AUX (BioMérieux)
- Solución salina (0,9%)
- Tubo referencia McFarland 2

- Micropipeta
- Programa de identificación de API Web™ (BioMérieux)

5.5 Aislamiento e Identificación de bacterias ácido lácticas

- Agar MRS (Difco)
- Agua peptonada 0,1% (Difco)
- Peróxido de hidrógeno
- Test de oxidasa (M)
- Kit de tinción gran: cristal violeta, yodo, safranina, alcohol cetona (QUIMICAL)
- Solución salina (0,9%)
- Palillos
- Portaobjetos
- Caja de metal (10x6x2 cm)
- Vela
- Microscopio óptico (OLYMPUS)
- Aceite de inmersión (OLYMPUS CORPORATION)
- Incubadora (SANYO)

5.6 Criopreservación de bacterias ácido lácticas identificadas

- Tubos crio 1,8 ml (Biomedic)
- Medio Brain Heart Infusion (Becton Dickinson-BD)
- Glicerol (PanReac AppliChem)
- Hisopos estériles
- Puntas (100-1000 µl)
- Micropipeta (100-1000 µl)
- Congelador a -20° C (Frigidaire)

5.7 Reactivación bacterias criopreservadas

- Agar MRS (Difco)
- Hisopos estériles
- Palillos estériles

- Gradilla
- Caja de metal (10x6x2 cm)
- Vela
- Incubadora (SANYO)

5.8 Extracción ADN por ebullición

- Agua libre de dnasas
- Tubos eppendorf (1,5 ml)
- Hisopos estériles
- Puntas (100-1000 μ l)
- Micropipeta (100-1000 μ l)
- Cocineta
- Olla
- Agua destilada
- Congelador a -20° C (Frigidaire)

5.9 PCR para gen 16S ARNr

- Primer (27F) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
- Primer (1492R) GGTTACCTTTTACGACTT
- Buffer 10x (Invitrogen)
- MgCl₂ 50 mM (Invitrogen)
- dNTPs 10mM (Invitrogen)
- Taq polimerasa 5 unidades/ μ l (Invitrogen)
- Agua libre de nucleasas (HyClone™ Hypure molecular biology grade water)
- Termociclador (BIO-RAD T100™ Thermal Cycler)
- Agarosa (Bioline)
- TBE 1X (Tris-borato EDTA)
- Bromuro de etidio
- Cámara de electroforesis (Labnet)
- Balanza analítica (ADAM)

5.10 Secuenciamiento del producto de PCR de la región del gen 16S ARNr

- Liofilizador TFD 5503 (Il Shin® Bio Base)
- Amplicones liofilizados
- Parafilm

5.11 Identificación de bacterias ácido lácticas a partir de secuenciamiento de ADN

- Paquete Staden (Pre gap y Gap 4)
- NCBI Blast

6. MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras

Se colectó un total de 24 muestras de chichas de jora provenientes de distintos lugares, entre restaurantes y mercados de la región norte del Ecuador (Tabla 1). Ninguna de estas bebidas fermentadas fue sometida a tratamiento térmico, no poseían ni aditivos ni preservantes comerciales. Todas las muestras fueron transportadas y conservadas a temperatura de 2 a 8° C en el Instituto de microbiología de la Universidad San Francisco de Quito para posteriores análisis.

Tabla N° 1 Origen de las 8 chichas recibidas provenientes de la región Norte del Ecuador

Denominación de la chicha	Provincia
Nat	Imbabura
Cot	
Qui1	Pichincha
Tab suave	
Tab fuerte	
Qui2	
Rio	Chimborazo
Gua	

6.2 Preparación de diluciones a partir de muestras (chichas de jora)

Se preparó 5 diluciones seriadas por cada muestra. La primera dilución se preparó con la diluyendo 25 ml de la muestra en 225 ml de agua peptonada al 0.1% (dilución 10^{-1}) y las

siguientes diluciones fueron preparadas con la transferencia de 1 ml de la dilución anterior en un tubo con 9 ml de agua peptonada al 0.1% hasta la dilución 10^{-5} .

6.3 Recuento de *Escherichia coli* y Coliformes

Se colocó 1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} respectivamente en una placa de medio Petrifilm 3M® para *E.coli* y Coliformes por duplicado, siguiendo los lineamientos del proveedor (3M, 2017). Las placas Petrifilm 3M fueron incubadas a 37° C por 24 horas en la incubadora del Instituto de Microbiología de la USFQ. Posterior a esto, se realizó el conteo por duplicado de cada placa mediante un contador de colonias (Boeco Germany). Se utilizó la guía de interpretación de recuento de colonias de Petrifilm 3M (3M, 2017). El límite de contaje recomendado en placas de Petrifilm es menor a 150 colonias; sin embargo, el área de crecimiento celular de la placa Petrifilm es de aproximadamente 20 cm² por lo que si existían más de 150 colonias se hizo una estimación contando el número de colonias en uno o más cuadrados representativos y se determinó el número promedio por cuadrado, luego se multiplicó el número promedio por 20 para determinar el conteo estimado por placa (3M, 2017). Se hizo un promedio entre cada uno de los duplicados y se calculó a partir de éste el número de UFC/ml con la fórmula descrita por Maturin y Peleer (2001).

6.4 Aislamiento e identificación de levaduras

Para proceder con el aislamiento, se sembró cada muestra directamente en agar Sabouraud con un hisopo estéril para realizar el inóculo primario, después con un asa de estriación se aplicó la técnica de estriado descrita por Tournas, et al (2001) para obtener los siguientes inóculos, esto se realizó por duplicado. las cajas fueron incubadas durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

Una vez obtenidas las levaduras aisladas en un cultivo puro, la identificación se realizó con los Kits 20 API AUX ®. En tubos de solución salina (0,9%) se suspendió colonias de

levaduras considerando una concentración inicial basada en la turbidez del estándar de McFarland 2. Posterior a esto, se colocó 100 µl de la solución suspendida en el medio API AUX y se homogenizó con la micropipeta. Se humedeció la tira de API AUX con agua destilada y se llenó las cúpulas con la solución suspendida en el medio API (BioMérieux SA, 2010). Posteriormente, se incubó durante 48 horas, se observaron resultados y se revisaron en el sistema API Web (BioMérieux, 2017).

6.5 Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas

Una vez procesadas las muestras, se sembró cada muestra mediante la técnica de vertido en placa (Alonso & Poveda, 2018), para esto se colocó 1 ml de cada dilución respectiva (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) en cajas Petri estériles, después se adicionó de 20 a 30 ml de Agar MRS y se homogenizó, esto se realizó por duplicado. Las cajas se incubaron en cajas de metal con una vela en su interior con el fin de generar un ambiente microaerófilico durante 48 horas a 37° C. Posterior a esto, se identificaron de 3 a 5 morfologías de colonias de posibles bacterias ácido lácticas por cada muestra. Se procedió a realizar las pruebas de la catalasa y la oxidasa y además se realizó tinción Gram para la identificación de morfología de cada colonia. Posteriormente, se aisló las colonias con características de bacterias ácido lácticas en Agar MRS durante 48 horas a 37° C en condiciones microaerófilicas y se almacenaron. Al tener ya todas las bacterias ácido lácticas aisladas, se procedió a criopreservarlas. Se colocó 1,8 ml del medio BHI + glycerol (20%) en crioviales, posteriormente, con hisopos se despegaron colonias del agar y se suspendieron en la solución, se rotulo debidamente y se procedió a colocar los crioviales en el congelador de -20°. A medida que se iban aislando e identificando fenotípicamente las bacterias ácido lácticas de cada chicha se iban criopreservando para posteriormente extraer ADN de todas las bacterias ácido lácticas aisladas y proceder a la identificación molecular. Una vez que se terminó de aislar las bacterias ácido lácticas de

todas las chichas de jora, se reactivaron en el Agar MRS, luego se estrío con palillos estériles y se llevó a incubación durante 48 horas a 37° en condiciones anaerobias.

6.6 Identificación molecular

Para la identificación molecular se procedió a realizar extracción de ADN de las bacterias aisladas, amplificación mediante PCR para el gen 16S ARNr y secuenciamiento del producto de PCR.

6.6.1 Extracción de ADN

Se procedió a extraer ADN de las bacterias ácido lácticas en fase exponencial, por el método de ebullición siguiendo el protocolo establecido por Coll, et al (2005) con algunas modificaciones. Se tomó 300 µl de agua libre de dnasas y se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml. Con un hisopo estéril se tomó 5 colonias de cada bacteria aislada, se suspendió en el tubo de 1,5 ml con el agua libre de dnasas, se etiqueto el tubo y se llevó a ebullición en baño maría durante 10 minutos. Se almacenó muestras en el congelador a -20° C durante 24 horas. Posteriormente, se cuantifico el ADN en el equipo NanoVue Plus con el fin de determinar la concentración de ADN necesaria para pruebas moleculares y se almacenaron a -20° C para pruebas posteriores.

6.6.2 PCR para gen 16s ARNr

Se utilizaron los primers 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) Y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). Las concentraciones y volúmenes de los reactivos de PCR por reacción se detalla en el anexo A, se consideró un volumen final de 10 µl. Se programó el tiempo del termociclador como se detalla en el anexo B con un tiempo de 1h 58 minutos de duración. Seguido a esto, se realizó el gel de agarosa al 1,5 %, con 1 µl de bromuro de Etidio y se programó la cámara de electroforesis a 90 V, 200 mA durante 43 minutos. Una vez

obtenidos los amplicones, se liofilizo a los mismos, se selló con Parafilm y se rotuló para enviarlos a la empresa Functional Biosciences (Estados Unidos).

6.7 Análisis de secuencias de ADN e identificación de especies de bacterias ácido lácticas

Las secuencias recibidas Forward y Reverse de la región 16S ARNr fueron analizadas con el paquete Staden (Pregap y Gap4) (Bonfield, et al., 1995), se alinearon las secuencias y se generó una secuencia consenso. A esta secuencia consenso, se analizó en la base de NCBI ©, con la herramienta BLAST (Altschul, 1990). La herramienta determinó la especie de las bacterias analizadas de acuerdo al porcentaje de similitud del 16S ARNr y las secuencias del Gen Bank.

6.8 Análisis fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos fueron medidos por estudiantes de Ingeniería Química en el laboratorio de Química de la Universidad San Francisco de Quito. Se realizó la medición del pH directamente con un potenciómetro Fisher Scientific modelo AR50. La determinación de acidez se realizó por titulación con una solución de 0.1N NaOH usando un titulador automático Mettler Toledo modelo 0 “Easy pH”.

7. RESULTADOS

7.1 Recuento de *E. coli* y Coliformes

Las chichas provenientes de Nat, Qui1, Tab fuerte, Tab suave, Cot y Gua, presentaron un contaje de Coliformes en un rango de $1,8 \times 10^2$ – $1,4 \times 10^5$ UFC/ml, como se muestra en la tabla N° 2. En cuanto a la presencia de *E. coli*, se encontró solamente en una chicha de una sola fecha del muestreo como se muestra en la tabla N° 2.

Tabla N° 2 Recuento de *E. coli* y Coliformes en las 24 chichas de diferentes tiempos

Chicha	Fecha de muestreo	Recuento <i>E.coli</i> (UFC/ml)	Recuento Coliformes (UFC/ml)
Nat	20/3/2018	<10	<10
	2/4/2018	<10	<10
	9/4/2018	<10	$9,0 \times 10^2$
Qui1	20/3/2018	<10	<10
	2/4/2018	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$
	9/4/2018	<10	$1,8 \times 10^2$
Tab fuerte	20/3/2018	<10	$1,4 \times 10^3$
	2/4/2018	<10	<10
	9/4/2018	<10	<10
Tab suave	20/3/2018	<10	$2,0 \times 10^3$
	2/4/2018	<10	<10
	9/4/2018	<10	<10
Cot	20/3/2018	<10	<10
	2/4/2018	<10	$1,4 \times 10^5$
	9/4/2018	<10	$2,2 \times 10^2$
Rio	16/4/2018	<10	<10
	23/4/2018	<10	<10
	7/5/2018	<10	<10
Gua	16/4/2018	<10	<10
	23/4/2018	<10	$2,7 \times 10^2$
	7/5/2018	<10	<10
Qui2	16/4/2018	<10	<10
	23/4/2018	<10	<10
	7/5/2018	<10	<10

7.2 Aislamiento e identificación de levaduras

Se aislaron las levaduras obteniendo un cultivo puro como se muestra en la figura N° 1. Se identificaron y se obtuvieron las siguientes especies de levaduras: *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica* y *Candida krusei*, la tabla N° 3 muestra las especies de levaduras encontradas en cada chicha.



Figura N° 1 Cultivo puro de levaduras aisladas por técnica de estriado de la dilución 10^0

Tabla N° 3 Especies de levaduras identificadas en las 24 chichas de diferentes tiempos

Chicha	Fecha de muestreo	Levadura
Nat	20/3/2018	<i>Candida Famata</i>
	2/4/2018	<i>Candida Famata</i>
	9/4/2018	<i>Candida Famata</i>
Qui1	20/3/2018	<i>Candida Famata</i>
	2/4/2018	<i>Candida Famata</i>
	9/4/2018	<i>Candida Famata</i>
Tab fuerte	20/3/2018	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	2/4/2018	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	9/4/2018	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tab suave	20/3/2018	<i>Candida Famata</i>
	2/4/2018	<i>Candida Famata</i>
	9/4/2018	<i>Candida Famata</i>
Cot	20/3/2018	<i>Candida Famata</i>
	2/4/2018	<i>Trichosporon mucoides</i> y <i>Cryptococcus laurentii</i>
	9/4/2018	<i>Candida Famata</i>
Rio	16/4/2018	<i>Candida utilis</i>
	23/4/2018	<i>Candida utilis</i>
	7/5/2018	<i>Candida utilis</i>
Gua	16/4/2018	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	23/4/2018	<i>Candida spherica</i>
	7/5/2018	<i>Candida spherica</i>
Qui2	16/4/2018	<i>Candida krusei</i>

	23/4/2018	<i>Candida krusei</i>
	7/5/2018	<i>Candida krusei</i>

7.3 Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas

Se aislaron un total de 84 bacterias ácido lácticas con un aproximado de 3 a 4 bacterias por muestra, en donde las 84 bacterias aisladas sugerentes de bacterias ácido lácticas fueron oxidasa negativa, catalasa negativa y bacilos Gram positivos como se muestra en la figura N° 2. Se seleccionaron 16 bacterias correspondientes a una fecha específica de muestro por cada chicha, es decir se seleccionaron un promedio de 2 bacterias por cada chicha (en una sola fecha de muestreo) y se extrajo ADN en una concentración de 10-20 ng/ μ l para el posterior análisis molecular.

A.

B.

C.

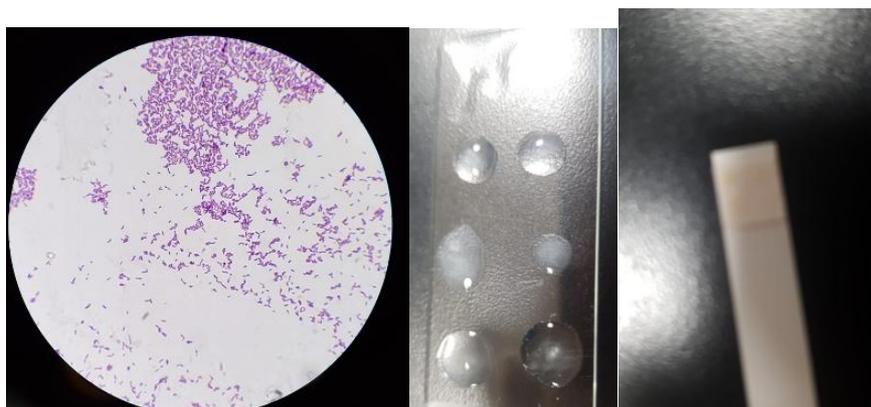


Figura No 2 Identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas A. Tinción gram (bacilos gram positivos: color violeta), B. Prueba de la catalasa (negativo) y C. Prueba de la oxidasa (negativo: sin cambio de coloración)

7.4 Identificación molecular

Se amplificó la región del gen 16S ARNr sin posibles contaminaciones y amplificaciones inespecíficas y se secuenció obteniéndose las especies de BAL identificadas.

7.4.1 Amplificación de la región del gen 16S ARNr mediante PCR

Los productos amplificados mostraron un fragmento de peso molecular de aproximadamente 1519 pb (Figura N° 3 y 4). Se descartó amplificaciones inespecíficas y posibles contaminaciones, pues el control positivo amplificó correctamente y el NTC no presentó ninguna amplificación.

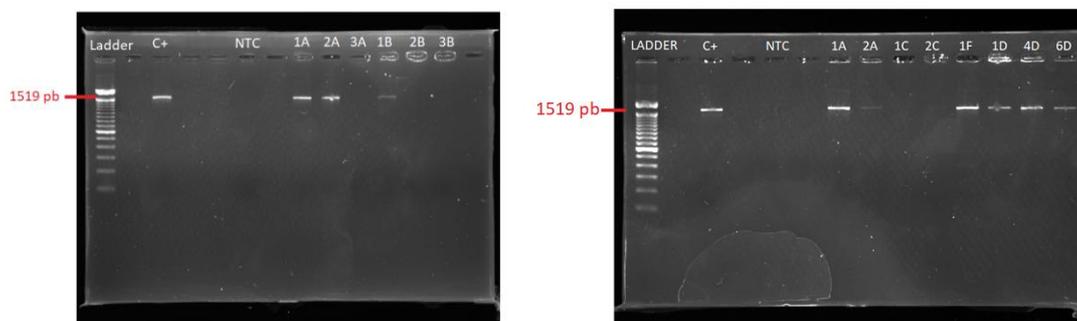


Figura No 3 Amplificación de la región del gen 16S ARNr. Gel de electroforesis al 1,5%: L: Ladder; 9 bacterias ácido lácticas: 1A, 2A, 1B, 1A, 2A, 1F, 1D, 4D, 6D; C+: control positivo; NTC: Not template control. Tamaño del amplicón ~1519 pb



Figura N° 4 Amplificación de la región del gen 16S ARNr. Gel de electroforesis al 1,5%: L: Ladder; 7 bacterias ácido lácticas: 1C, 2C, 1B, 2B, 2B1, 2C, 3C; C+: control positivo; NTC: Not template control. Tamaño del amplicón ~1519 pb

7.4.2 Análisis de secuencias de ADN e identificación molecular de bacterias ácido lácticas

Una vez que se obtuvieron los amplicones liofilizados, se mandó a secuenciar a la empresa Functional Biosciences. Las secuencias se alinearon con el paquete Staden (Bonfield, et al., 1995), y se generó la secuencia consenso, la misma que fue analizada en NCBI con la herramienta BLAST (Altschul,1990), al comparar las secuencias con el Gen Bank del NCBI

se encontraron las siguientes especies de bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus casei* correspondientes a las 16 bacterias de las 8 chichas como se observa en la tabla N° 4. Además, se muestra el porcentaje de homología y el score obtenido al momento de comparar las secuencias con la base de datos.

Tabla N° 4 Especies de BAL identificadas mediante secuenciación de ADN

Chicha	Fecha de muestreo	Codificación	BAL	% Homología
Nat	20/3/2018	1B20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,9
		2B20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
Qui1	20/3/2018	1A20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100
		2A20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100
Tab fuerte	20/3/2018	1F20	<i>Lactobacillus casei</i>	100
Tab suave	20/3/2018	1C20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100
		2C20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,3
Cot	2/4/2018	1D2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
		4D2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,81
		6D2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
Rio	23/4/2018	1A23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
		2A23	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,8
Gua	23/4/2018	1B23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
		2B23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
Qui2	16/4/2018	2C16	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100
		3C16	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,8

7.5 Determinación de parámetros fisicoquímicos

Se encontró en todas las chichas un rango de pH de 3,1- 4,3, un rango de etanol de 0,1- 5,6% y un rango de acidez de 0,2 - 5,1% como se muestra en la tabla N° 5.

Tabla N° 5 Parámetros fisicoquímicos de las 24 chichas en diferentes tiempos

Chicha	Fecha de muestreo	pH	% etanol	% acidez
Nata	20/03/2018	3,3	5,1	0,8
	2/4/2018	3,5	3	0,5
	9/4/2018	4,3	0,5	0,2
Qui1	20/3/2018	3,9	3,7	0,5
	2/4/2018	3,5	1	1
	9/4/2018	3,5	3	0,9
Tab fuerte	20/3/2018	3,5	3,7	1
	2/4/2018	3,4	2,8	1,2
	9/4/2018	3,4	2,7	1,3
Tab suave	20/3/2018	3,8	5,4	0,8
	2/4/2018	3,8	3,7	0,7
	9/4/2018	4	3,4	0,7
Cot	20/3/2018	3,9	3,2	0,4
	2/4/2018	4	3,4	0,4
	9/4/2018	3,9	5,6	0,5
Rio	16/4/2018	3,7	1,8	0,4
	23/4/2018	3,1	0,1	5,1
	7/5/2018	3,8	0,1	0,8
Gua	16/4/2018	3,6	0,5	0,5
	23/4/2018	3,8	2	0,5
	7/5/2018	3,7	1,9	0,5
Qui2	16/4/2018	3,5	0,1	0,3
	23/4/2018	3,7	0,2	0,6
	7/5/2018	3,5	0,1	0,5

8. DISCUSIÓN

8.1 Recuento de *E. coli* y Coliformes

La chicha de jora considerada una bebida artesanal y tradicional que se consume en varios restaurantes y mercados procedentes de la Región Norte del Ecuador, requieren un análisis de calidad microbiológica mediante el recuento de *E. coli* y Coliformes que aseguren calidad e inocuidad de la bebida para el consumidor. Se encontró la presencia de Coliformes en ciertas chichas reflejando un contaje de Coliformes por encima del límite permitido máximo (100 UFC/ml) que impone la Norma INEN 2395 (INEN, 2011). Esto coincide con Andrade (2015) que en chichas de jora ha reportado contajes de Coliformes cercanos (90 UFC/ML) al límite permitido máximo, de igual forma Farinango (2015), reporta contajes de Coliformes en chichas de jora superiores al límite permitido máximo y además, en cierto número de chichas reportó ausencia de Coliformes, lo que concuerda con esta investigación. La presencia de Coliformes totales considerándose un indicador de calidad, sugiere que existió contaminación ambiental. La contaminación puede darse tanto en el proceso de elaboración de la chicha como en el almacenamiento y transporte en cuanto a las medidas sanitarias que se aplican para comercializar y consumir el producto (Martín, et al., 2016). Dentro del proceso de elaboración existe una deficiencia en la manipulación e higiene de la materia prima, así como del producto terminado destacando un manejo simultáneo de dinero y la bebida, o el uso de joyas, contaminación cruzada, barniz de uñas en el caso de mujeres (Bayona, 2009). Además, se puede deber a un inadecuado manejo y suministro del agua (materia prima) y una contaminación por los utensilios y recipientes mal desinfectados (Bayona, 2009). Actualmente, existen procedimientos generales básicos para la manipulación de alimentos ayudando a prevenir el riesgo de contaminación y contribuir a un aumento en la seguridad

alimentaria, en donde todas estas medidas se reducen en buenas prácticas de manufactura y de higiene. (Acuña, et al., 2014).

La calidad de la chicha en cuanto a su vida útil y mantenimiento de sus características organolépticas, también se relaciona con la presencia de Coliformes totales. De acuerdo a Aguirre (2016), a una mayor carga microbiana en la bebida, el tiempo de vida útil va a disminuir, por lo que elevados contajes de Coliformes totales van a asociarse con un deterioro precoz del alimento y cambio en las características organolépticas. Los daños que pueden provocar en la chicha es un cambio en el sabor (más amargo) debido a la remoción de ciertos componentes de la bebida que estos microorganismos utilizan en su metabolismo como fuente de azúcares produciéndose otros metabolitos que van a alterar el sabor. Además, existen cambios de color o decoloración, cambios de textura, cambios en el sedimento y alteraciones en el olor por el deterioro de la bebida (Downs, 2001). Es importante mencionar que, bacterias del grupo Coliforme son capaces de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas en gran cantidad las cuales alteran también las propiedades de la chicha a lo largo del tiempo, produciendo sabores amargos en el caso de la proteólisis y sabores rancios en el caso del lipolisis (Inat, 2016). Estas enzimas son difíciles de inactivar por medios tecnológicos, por lo que se debe reducir el riesgo de la producción de estas enzimas en la propia materia prima (Inat, 2016), en este caso, la jora (maíz germinado) posee naturalmente enzimas proteolíticas y lipolíticas que son inactivadas en la cocción de la chicha con el fin de que no intervengan en las características organolépticas del producto final (Briceño & Castro, 2014).

Con relación a *Escherichia coli*, esta bacteria indicadora de contaminación fecal fue hallada en una sola muestra incumpliendo con la Norma INEN 2395 que denota ausencia como su límite permitido máximo (INEN, 2011). La presencia de esta bacteria implica contaminación fecal, indicando que la contaminación fue sido reciente, y su presencia puede ser un riesgo para el consumidor (Rodríguez, 2015). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado

por Arroyo, et al (2011) que reporta la presencia de *E. coli* en chichas. De acuerdo a Valdivieso, et al (2006), la posibilidad de contaminación fecal a través de las manos de los operarios presenta un riesgo muy alto, ya que el autor ha encontrado *E. coli* en frotis de manos de manipuladores de alimentos. Además, la presencia de *E. coli* puede implicar la presencia de otros patógenos intestinales. Se han encontrado patógenos como *Salmonella* en varios alimentos fermentados. Sin embargo, es importante mencionar que estas bacterias del grupo Coliforme podrían ser responsables de la fermentación de las chichas.

8.2 Aislamiento e identificación de levaduras

Con el fin de determinar un proceso de fermentación predecible es necesario conocer las especies de levaduras implicadas en la fermentación de la chicha. Las levaduras principalmente producirán compuestos de aroma y sabor (Prakash, et al., 2015). En esta investigación, se identificaron especies como: *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica* y *Candida krusei*. Levaduras pertenecientes al género *Candida*, fueron las que predominaron en las 24 chichas. Esto puede deberse a que, varias levaduras de este género se caracterizan por ser tolerantes a porcentajes de etanol altos y poseen un alto poder fermentativo (Ranganathan & Bhat, 1958).

Las chichas originarias de Nat, Qui1 y Tab Suave en las 3 diferentes fechas presentaron la misma levadura (*Candida famata*), lo cual sugiere un proceso de elaboración uniforme de la chicha en los tres sitios. Por otro lado, las chichas originarias de Tab fuerte en las 3 fechas, también presentaron la misma levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), indicando de igual forma un proceso uniforme al momento de su elaboración. Las chichas provenientes de Rio presentaron la misma levadura (*Candida utilis*) en los 3 tiempos establecidos, demostrando uniformidad en su proceso de elaboración. Por otro lado, las 3 chichas pertenecientes a Cot

presentaron *Candida famata*; *Cryptococcus laurentii* y *Trichosporon mucoides* lo que indica un proceso de elaboración de la chicha no uniforme con variaciones en su fabricación.

Las chichas provenientes de Gua presentaron *S. cerevisiae*; y *Candida sphaerica* denotando variación en el proceso de elaboración. Finalmente, en las chichas originarias de Qui2 se obtuvieron la misma levadura en los 3 muestreos (*Candida krusei*), demostrando uniformidad en la elaboración.

En un estudio realizado por Varela & Borneman (2016), los autores encontraron *Candida famata* en la fermentación del vino, así mismo otros autores reportan la presencia de esta especie de levadura en la fermentación de bebidas alcohólicas en general, en la fermentación de la aceituna, en salami seco, en la fermentación de chicha de uva, en la fermentación de la kombucha, derivado de lácteos y en chichas de maíz morado, jora y arroz (Freire, 2015). *Candida famata* es una levadura capaz de crecer a una temperatura de 37° C y a un pH de 2,6. Ha sido aislada de varias fuentes naturales, pero más frecuentemente de productos alimenticios procesados, asimila la glucosa, galactosa, maltosa, sucrosa, D- manitol, D- glucitol y entre otros., es capaz de producir riboflavina, es halotolerante y realiza una fermentación alcohólica (Kosyantyn & Andriy, 2012). Además, proporciona el sabor y olor característico a la chicha, debido a la producción de metabolitos conocidos como congénicos como ésteres, ácidos orgánicos, carbonilos y alcoholes, acetaldehído, especialmente acetato de amilo y glicerol que hace más viscosa a la chicha. Sin embargo, también se ha visto que *Candida famata* es responsable de formar un velo blanco en la superficie del fermento (Acevedo, et al., 2015).

Saccharomyces cerevisiae, es una levadura que se ha reportado en un sin número de productos fermentados, Barbosa, et al., (2018), ha encontrado esta especie al final de la fermentación en chichas de jora elaboradas en Ecuador lo que concuerda con la presente investigación. *S. cerevisiae* es la levadura más frecuentemente utilizada en procesos

industriales donde se requiere un mayor control de la fermentación. Se caracteriza por poseer un alto poder fermentativo, produce grandes porcentajes de etanol; sin embargo, no produce tanta cantidad de congénicos que son los que brindan aroma y sabor (Acevedo, et al., 2015). Fermenta hexosas, posee una alta tolerancia al etanol debido a su pared celular rígida y su membrana plasmática constituida por diferentes fosfolípidos; además, la tolerancia depende también de la temperatura y del oxígeno, a medida que aumenta la temperatura los fosfolípidos de la membrana se verán afectados, y a una baja concentración de oxígeno la pared celular será más débil impidiendo la tolerancia a cambios de concentración elevados de etanol (Acevedo, et al., 2015). Es tolerante al SO₂, compuesto utilizado para inhibir el crecimiento de otras levaduras y bacterias (Acevedo, et al., 2015).

Cryptococcus laurentii se ha visto implicada en la fermentación de granos de café y de acuerdo a López (2015), el autor reportó la presencia de *Cryptococcus laurentii* en chichas de jora elaboradas en Imbabura coincidiendo con la presente investigación. El autor asegura, que la contaminación con estas levaduras, se atribuye a aves domésticas que actúan como portador y se consideran patógenos para los seres humanos. La presencia se debe a las condiciones de preparación de la chicha en donde la materia prima pudo haber sido expuesta a animales del campo.

Por otro lado, Pazmiño et al (2014) encontró *Trichosporon mucoides* en chichas de arroz producidas en la provincia de Bolívar, y Velasco (2016) en chichas de uva. *T. mucoides* tiene como hábitat natural el suelo, agua de río, agua de mar, agua de lagos, plantas y alimentos fermentados y fermenta la glucosa, pero en bajas concentraciones.

Candida utilis es una levadura que se puede encontrar aislada de flores; sin embargo, se ha reportado su presencia en alimentos fermentados como las chichas de arroz, queso y el guarapo (Pazmiño, et al., 2014), además se ha encontrado esta levadura en bebidas fermentadas provenientes de Nigeria (Acevedo, et al., 2015). Durante la fermentación, es

capaz de producir monelina, α -amilasa, carotenoides y ácidos orgánicos que otorgaran las características organolépticas al producto fermentado.

Candida sphaerica, es una levadura que se ha reportado en chichas de arroz, chichas de uva, chichas de jora y otros alimentos como en productos lácteos fermentados y vegetales fermentados (Pazmiño, et al., 2014). *C. sphaerica* tiene como hábitat natural los vegetales, cereales remojados, piel de humanos y animales por lo que su presencia se debe a ingredientes utilizados y por el proceso fermentativo por el cual atraviesa el sustrato. Específicamente, la presencia en las chichas de jora esta investigación puede deberse a su elaboración con cereales remojados (maíz). Esta levadura se caracteriza por crecer una vez existida una fermentación alcohólica anterior, debido a que depende de este proceso para conseguir su energía metabólica, por esta razón, solamente se encuentra en etapas finales de fermentación (López, 2015). Durante la fermentación, produce otros compuestos como ácidos orgánicos, esterres y diacetilo que contribuirán al sabor y aroma de la chicha (Schaechter, 2009).

En cuanto a *Candida krusei*, esta se ha encontrado en la fermentación del cacao y de cereales. Ha sido aislada de diferentes hábitats, alimentos fermentados y productos lácteos. Realiza fermentación alcohólica, y produce metabolitos como el etanol, ácido acético, ácidos orgánicos y entre otros (Jerspersen, 2005).

A pesar de que todas estas especies de levaduras anteriormente mencionadas producen congenéricos, las mismas levaduras y bacterias ácido lácticas proporcionan las condiciones necesarias para que otros microorganismos que se encuentran en cantidades pequeñas, sintetizen pequeñas cantidades de compuestos (congenéricos) que van a ser los que más propiedades organolépticas brinden a la chicha; sin embargo, sintetizar y extraer estos compuestos resulta ser muy costoso. Es importante mencionar que, la producción de los

congénicos se ve afectada por la temperatura, las fermentaciones intermedias, tipos de carbohidratos y el sustrato a fermentar (Acevedo, et al., 2015).

8.3 Identificación molecular de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas van a producir ácido láctico, y otros compuestos que van a inhibir el crecimiento de otros microorganismos patógenos reduciendo también el pH y el azúcar disponible en el medio prolongando la vida útil del alimento o bebida.

se identificaron 3 diferentes especies de bacterias ácido lácticas en las 8 chichas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*. Estas especies de *Lactobacillus*, cumplen un rol importante en la fermentación de productos a base de frutas, cereales y tubérculos, tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas inhibiendo el crecimiento de patógenos. Además, especies de este género resisten a ciertas concentraciones de etanol, por lo que su presencia es esperada.

Behera, et al. (2018), ha reportado la presencia de *Lactobacillus plantarum* en la fermentación de vegetales, frutas, pescado, carne, productos lácteos, cereales y también en chichas de jora. *L. plantarum* tiene la habilidad de sobrevivir en el tracto gastrointestinal, se adhiere a las células epiteliales considerándose seguras para el ser humano y animales, por ello es considerada una bacteria probiótica.

En cuanto al proceso de fermentación, *L. plantarum* es heterofermentativa facultativa, es decir convierte las hexosas en ácido láctico, pero en ciertas condiciones, se produce además dióxido de carbono y etanol (Plumeed, 2012). Esta bacteria, es capaz de producir dipéptidos cíclicos antimicrobianos, elevadas cantidades de vitaminas como vitamina B12 y riboflavina. Produce compuestos biopreservativos, exopolisacáridos, bacteriocinas, compuestos antioxidantes y entre otros (Behera, et al, 2018). Además, la presencia de esta se relaciona

con estabilidad en la calidad de la chicha, un mejor sabor y beneficios en la salud (Behera, et al, 2018).

Por otra parte, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* pertenecen a un grupo taxonómico estrechamente cercano, también han sido aislados de un sin número hábitats, se asocian mayormente a productos lácteos, y también se han encontrado en chichas de jora (Freire, 2015). Además, forman parte de la microbiota normal del humano y del intestino de animales, debido a esto se consideran como probióticos.

Pertenecen al grupo de heterofermentativos facultativos al igual que *L. plantarum*, produciendo L-ácido láctico a partir de hexosas mediante la vía Embden-Meyerhof reduciendo el pH de la chicha. Domínguez, Schätzthauer y Zamudio (2010), reportaron la presencia de *L. casei* en chichas de jora y asociaron su presencia con altos porcentajes de acidez coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación, en donde en la chicha (Tab fuerte) con el mayor porcentaje de acidez fue donde se encontró *L. casei*. Durante la fermentación, *L. casei* y *L. paracasei* producen una variedad de metabolitos como bacteriocinas, ácidos orgánicos y ácido acético, el cual tendrá una mayor capacidad inhibitoria que el ácido láctico. También produce dióxido de carbono creando un ambiente anaeróbico toxico para microorganismos aerobios y diacetilo, contribuyendo al aroma y sabor (Caplice & Fitzgerald, 1999).

8.4 Parámetros fisicoquímicos

Barbosa, et al. (2018) obtuvo parámetros fisicoquímicos parecidos en cuanto al pH y porcentaje de etanol encontrados en esta investigación cuando estudiaban chicha de jora, de morocho y de yuca. De acuerdo a los autores, el pH de la chicha de jora se encontraba entre 2,62-4,14 y el porcentaje de etanol entre 0,20% y 5,97%. Los porcentajes bajos de etanol en varias de las muestras presentes en este estudio sugieren que la fermentación principalmente

fue llevada a cabo por bacterias ácido lácticas en lugar de una fermentación llevada a cabo por levaduras. Sin embargo, existieron porcentajes considerables de etanol en varias de las chichas producidas por la fermentación de las levaduras anteriormente mencionadas. Los valores de pH bajos son los esperados en esta bebida fermentada debido a que los productos de la fermentación como el ácido láctico y ácidos orgánicos en general disminuyen el pH de la chicha (Prakash, et al, 2015). En cuanto a la acidez, esta se refiere al nivel de ácidos orgánicos presentes en las muestras, en la chicha la acidez titulada se encuentra expresada como ácido láctico. Zambrano (2012) obtuvo porcentajes de acidez similares a los encontrados en este estudio en chichas de maíz, el autor reportó valores entre 0,26 % - 0,61%. *L. casei* podría ser el responsable del aumento de acidez en las chichas como se ha demostrado en otros estudios, de igual manera, porcentajes altos de acidez expresados en ácido láctico podrían inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación como *E. coli* y Coliformes totales.

9. CONCLUSIONES

- Se identificaron 3 especies diferentes de bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*, las cuales son responsables de la producción de ácido láctico, reducción de pH, compuestos que inhiben crecimiento de microorganismos y producción de congénicos.
- Se identificaron 7 especies diferentes de levaduras: *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica* y *Candida krusei* las cuales son responsables de producción de etanol y metabolitos que contribuyen al aroma, sabor y textura de las chichas.
- Las chichas se encontraron dentro de valores esperados de pH, etanol y acidez los cuales se relacionan directamente con la actividad de bacterias ácido lácticas y levaduras, incluso Coliformes que podrían ser responsables de la fermentación
- En la mayoría de chichas se evidenció un proceso de elaboración uniforme con excepción de 2 chichas provenientes de 2 localidades diferentes, lo que demuestra que la elaboración de chicha es artesanal sin un proceso estandarizado.

10. RECOMENDACIONES

- Estudios sobre factores que influyen en síntesis y regulación de compuestos del aroma y sabor derivados de levaduras.
- Identificar levaduras y BAL en distintas etapas de fermentación.
- Con el fin de identificar la microbiota de las chichas y varios de los microorganismos no cultivables se recomienda realizar metagenómica.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 3M. (2006). *Placas Petrifilm™ para el Recuento de Coliformes* Disponible en <https://multimedia.3m.com/mws/media/444943O/petrifilm-coliform-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf>
- ACG. (2005). *The benefit of fermented foods*. The American College of Greece. Disponible en https://www.acg.edu/ckeditor_assets/attachments/2171/KTF_The_Benefits_of_Fermented_Foods.pdf
- Acevedo, C., et al. (2015). *Non-Saccharomyces yeast importance during fermentation of alcoholic beverages*. Universidad Autónoma de Coahuila
- Acuña, S., Ruiz, M., Zamora, L. & Bustamante, O. (2014). *Assessment of microbial quality of the food that are sold at the university señor de sipan and surroundings. december 2013*. Universidad Señor de Sipán
- Aguirre, D. (2015). *Calidad microbiológica y su relación con la vida útil en quesos frescos expendidos en tres mercados de trujillo. agosto – octubre, 2014*. Universidad César Vallejo
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410. *PubMed*
- Alonso, N. & Poveda, J. (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm 3M para el análisis de alimentos*. Pontificia Universidad Javeriana
- Andrade, V. (2015). "Elaboración de un manual de buenas prácticas de manufactura (bpm) en la producción de chichas de jora y morada en la Fundación Andinamarca calpi-Riobamba". Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
- Arroyo, A., et al, (2011). Perfil microbiológico de la chicha de venta ambulante en Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela. *Salud Arte y Cuidado*. 4(1):13-24:

- Asanza, C. (2018). *Análisis Cultural y Sensorial de la chicha de jora elaborada en la sierra norte ecuatoriana (Imbabura y Pichincha)*. Universidad San Francisco de Quito
- Baroni, A., et al (2017). *Análisis físico-químico y sensoriales de los alimentos*. Córdoba: Disponible en <https://cicytac.cba.gov.ar/wp-content/uploads/2018/03/AnalisisFisico-QuimicosSensoriales.pdf>
- Barbosa, F., et al. (2018). Saccharomyces cerevisiae populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49: 808–815
- Blanco, F., et al. (2011). Calidad microbiológica de alimentos remitidos a un laboratorio de salud pública en el año 2009. *Rev. salud pública*. 13 (6): 953-965, 2011
- Behera, S., et al. (2018). *Lactobacillus plantarum with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods*. BioMed Research International Volume 2018
- Biomerieux. (2018). *APIWEB*. Disponible en <https://www.biomerieux-diagnostics.com/apiwebtm-0>
- Bonfield, J.K., Smith, K.F. and Staden, R. (2005). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23, 4992-4999
- Briceño, K. & Castro, K. (2014). *Influencia del tiempo de cocción en las características físicoquímicas de la chicha de jora*. Universidad Nacional de Trujillo
- Caplice, E. & Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50: 131–149
- Chang, Lin, Chen, Carvaja, Portero, James, et al. (2012). Candida theae sp. nov., a new anamorphic beverage-associated member of the Lodderomyces clade. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1), 10-14.

- Coll, P., Coque, T., Domínguez, A., & Vázquez, J. (2005). *Metodos moleculares de tipificación epidemiología en bacteriología*. Sociedad Española de Enfermedades
- Domínguez, M., Schätzthauer, M., & Zamudio, M. (2010). *Desarrollo de una bebida fermentada a base de maíz utilizando bacterias probióticas*. Disponible en http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_III/CIII-45.pdf
- Doyle M., Beuchat L. (2007). *Food Microbiology*. Editorial ASM Press, 3era edition,
- Downs, F. & Ito, K. (2001). *Compendium of methods for de Microbiological Examination of foods*. 4ta edición. APA: Washington
- Escudero, B. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las principales bebidas fermentadas tradicionales de la provincia de bolívar – ecuador*. Universidad Tecnológica Equinoccial
- Farinango, E. (2015). “*EVALUACIÓN NUTRICIONAL Y DISEÑO DEL ETIQUETADO DE LAS CHICHAS (JORA Y MORADA), ELABORADAS EN LA FUNDACIÓN ANDINAMARKA, CALPI-RIOBAMBA*”. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:
- FAO. (2018). *La fermentación en pequeña escala*. Disponible en <http://www.fao.org/ag/esp/revista/9812sp3.htm>
- Freire, A. (2015). *Streptococcus salivarius bacteria associated to human saliva is a major component of indigenous beer (chicha) from Ecuador*. Universidad San Francisco de Quito
- González, L., Guzmán, J., Guerrero, A., et al. (2011). Bioactive peptides released by lactic acid bacteria in commercial fermented milks. *Rev. Mex. Ing. Quím* vol.10 no.2
- Gibbons, J. & Rinker, D. (2015). *The Genomics of Microbial Domestication in the Fermented Food Environment*. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4695309/>

- Guinea J., Sancho J., Pares R. *Análisis Microbiológicos de Aguas, Aspectos Aplicados*. Ediciones Omega: Barcelona. 1979, 122 pp.
- Haller L., Pote J., Loizeau J-L., Wildi W. Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. *Ecol. Indic.* 2009, 9: 540-547
- Hayashida, F. (2008). Ancient beer and modern brewers: Ethnoarchaeological observations of chicha production in two regions of the North Coast of Peru. *Journal of Anthropological Archaeology*, 27, 161-174.
- Inat, C. (2016). *Estudio sobre el crecimiento de bacterias proteolíticas y lipolíticas en leche y quesos obtenidos a partir de cabras tratadas con Enrofloxacin*. Universitat Politècnica de Valencia
- Jay, J. (2005) Indicators of Food Microbial Quality and Safety. In: *Modern Food Microbiology*. Food Science Text Series. Springer, Boston, MA
- Jerspersen, L. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5: 441-443
- Kosyantyn, D. & Andriy, A. (2012). *Candida famata*. Wiley Online Library
- Larrea, J., et al. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC* vol 44
- Liguori, L., et al. (2015). *Quality Improvement of Low Alcohol Craft Beer Produced by Evaporative Pertraction*. CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS. Vol 43
- López, W., et al. (2010). Yeast diversity associated to Colombian traditional "chichas". *Rev. colomb. biotecnol.*, Volumen 12, Número 2, p. 176-186
- López, C., et al. (2014). *Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage*. Wiley Online Library. 13: 1031-1048

López, H. (2015). *Diversidad microbiana asociada a los procesos de fermentación de la chicha de jora de Imbabura-Ecuador*. Universidad Tecnológica Equinoccial

López, E. (2015). *Caracterización físico - química y microbiológica de las bebidas fermentadas de la provincia de santo domingo de los tsáchilas*. Universidad Tecnológica Equinoccial

Marshall, E. & Mejía, D. (2017). *Traditional fermented food and beverages for improved livelihoods*. Roma: Rural Infrastructure and Agro-Industries Division Food and Agriculture Organization of the United Nations

Martin, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2354-2359.

Martín, M. (2009). MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF FOOD ACQUIRED IN STREETS OF A NORTHERN AREA OF BOGOTÁ. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 12 (2): 9-17

Martin, N., et al. (2016). The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. *Frontiers in Microbiology*. 7:1549:

Monroy, H., et al. (2016). YEAST: DESCRIPTION AND STRUCTURE. PubBioMed Central Research Publishing Services. pp.4-13

OMS. (2015). *Carga de enfermedades alimentarias*. Disponible en https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/fergonepager_es.pdf?ua=1

Prakash, J., et al. (2015). *Microorganisms in Fermented Foods and Beverages*. Chapter 1. pp.1-110

Pazmiño, D. (2013). *Diversidad microbiana asociada a los procesos de fermentación de la chicha de arroz en la provincia bolívar*. Universidad Tecnológica Equinoccial

Plumed, C. (2007). *Lactobacillus plantarum*. Universidad de Kuopio

- Ranganathan, B. & Bhat, V. (1958). *Ethanol tolerance of some yeasts*. Indian Institute of Science
- Ramos, L., et al. (2008). *Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales) en la bahía de santa marta, caribe colombiano*. Acta biol. Colomb., Vol. 13 No. 3, 2008 87 - 98
- Ramirez, J., et al. (2011). *Diversidad microbiana asociada a los procesos de fermentación de la chicha de arroz en la provincia bolívar*. Universidad Autónoma de Nayarit
- Rodríguez, C. (2015). Calidad microbiológica de helados artesanales expendidos en las afueras de instituciones educativas en Ciudad Bolívar, Venezuela. *Vector 10* (2015) 33 - 37
- Rosas, A. (2012). *Análisis de la chicha de jora como elemento de identidad gastronómica y cultural de la ciudad de cuenca*. Universidad de Cuenca
- Salminen, S. & Wright, A. (2004). *Lactic Acid Bacteria*. 3rd edition. CRC Press
- Sanlier, N., Gokcen, B. & Ceyhun, A. (2017). Health benefits of fermented foods. *Journal Critical Reviews in Science and Nutrition*
- Schaechter, M. (2009). *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press
- Suárez, P. (2017). *“Características organolépticas y determinación de parámetros físicoquímicos de la chicha de jora preparada por método tradicional y mukeado”*. Universidad César Vallejo
- Tournas, V., et al. (2001). *BAM: Yeasts, Molds and Mycotoxins*. Disponible en <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm>
- VALDIVIESO, N.; VILLALOBOS, L.; MARTÍNEZ, R. 2006. Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumana-Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 26(2):95-100
- Vallejo, Miranda, Flores, Sanchez, Ageitos, Gonzales, et al. (2013). Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOFMS and gene sequencing are the main

responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. *Systematic and Applied Microbiology* (36), 560-564.

Varela, C. & Borneman, R. (2016). *Yeasts found in vineyards and wineries*. Wiley Online Library. 34: 111–128

Velasco, S. (2016). *Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha de uva*. Universidad Tecnológica Equinoccial

Zambrano, M. (2012). *Evaluación microbiológica, ph y acidez titulable del proceso de fermentación de la chicha de maíz y masato en un establecimiento del estado táchira*. Universidad Nacional Experimental de Táchira San Cristóbal

12. ANEXOS

ANEXOS A: Protocolo para PCR de gen 16s ARNr

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN 1X
H ₂ O	-	-	6 µL
BUFFER	1X	10X	1µL
MgCl ₂	2 mM	50mM	0,4µL
dNTPs	0,2 mM	2 mM	1µL
27F	0,2 µM	10 µM	0,2 µL
1492R	0,2 µM	10 µM	0,2 µL
TAQ POLIMERASA	1U	5U	0,2 µL
ADN	0,1 NG/ µL	-	1 µL

ANEXO B: Programación de termociclado para amplificación de región 16s
ARNr

PROGRAMA	T °C	TIEMPO	CICLO
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	94	2 MIN	
DESNATURALIZACIÓN	94	45 SEG	34
HIBRIDACIÓN	55	30 SEG	
POLIMERIZACIÓN	72	1 MIN	
EXTENSIÓN FINAL	72	5 MIN	
REPOSO	20	∞	

